

The molecular basis of APC-resistance: role of coagulation factor abnormalities

Citation for published version (APA):

Brugge, J. M. (2006). *The molecular basis of APC-resistance: role of coagulation factor abnormalities*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060224jb>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060224jb](https://doi.org/10.26481/dis.20060224jb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Blood coagulation proceeds through a complex series of enzymatic reactions in which protease zymogens are activated via limited proteolysis, eventually leading to the generation of thrombin, the central enzyme in coagulation. Adequate regulation of the amount of thrombin formed is necessary to prevent both bleeding and thrombotic disorders. The protein C pathway is a major anticoagulant mechanism that plays an important role in the regulation of thrombin formation. Activated protein C (APC), a vitamin K-dependent protein, inactivates coagulation factors FVIIIa and FVa. Protein S serves as a cofactor of APC during these inactivation reactions. It has been shown that FV also expresses APC-cofactor activity in the inactivation of FVIII(a). The addition of APC to plasma causes a prolongation of the clotting time, but the plasma of some individuals is insensitive to this regulatory function of APC, a phenotype known as APC-resistance. APC-resistance is associated with an increased risk for venous thrombosis.

APC-resistance is most often caused by a mutation in the FV gene which causes the substitution of an Arg by a Gln at position 506 (FV_{Leiden}). This mutation abolishes one of the APC-cleavage sites on FV(a) which makes FVa_{Leiden} is less susceptible to inactivation by APC. Furthermore, as FV has to be cleaved at Arg⁵⁰⁶ to serve as a cofactor for APC in the inactivation of FVIII(a), this mutation also reduces the anticoagulant activity of FV_{Leiden}. Apart from the FV_{Leiden} mutation, several other FV gene mutations also cause APC-resistance, such as the R2-haplotype. The polymorphisms that define the R2-haplotype do not affect the susceptibility of FVa-R2 towards inactivation by APC, but they specifically reduce the APC-cofactor activity of FV-R2.

Since FV(a) is both a substrate and a cofactor for APC, mutations in the FV gene can cause APC resistance either by reducing the susceptibility of FVa to APC-mediated inactivation (FV_{HongKong} and FV_{Cambridge}) or by interfering with the APC cofactor activity of FV in FVIIIa inactivation (R2-haplotype) or by affecting both FV functions at the same time (FV_{Leiden}). This thesis mainly focuses on the cofactor activity of FV in the inactivation of FVIII(a) by APC and its role in APC-resistance.

Chapter 2 illustrates the molecular mechanism by which the amino acid substitution at position 2194 in the FV molecule, changing an aspartate into a glycine, is the main contributor to the reduced FV levels in plasma of carriers of the R2-haplotype. Molecular dynamics simulations and electrostatic computations indicated that the Asp2194Gly mutation causes an overall destabilization of the FV C2-domain by disturbing the electrostatic interactions

within the triad Asp2194-Lys2101-Lys2103. Under normal conditions (no mutation) these electrostatic interactions facilitate the formation of the disulfide bridge between Cys²⁰³⁸ and Cys²¹⁹³ located at the N-terminal and the C-terminal parts of the C2-domain respectively, thereby stabilizing the molecule. The replacement of the negatively charged aspartate by a neutral glycine disturbs the correct folding of the C2-domain, resulting in the retention and degradation of the FV molecule in the ER and therefore a reduced secretion in plasma. These *in silico* data were confirmed by experimental data using recombinant molecules, showing that any mutation affecting this electrostatic triad (Asp2194-Lys2101-Lys2103) greatly reduces the level of secretion.

In **chapter 3** we have focused on the anticoagulant activity of FV in the inactivation of FVIII(a) by APC and its role in APC-resistance. First, we have quantified the relative contributions of reduced susceptibility of FVa towards inactivation by APC and impaired APC-cofactor activity of FV to FV_{Leiden}-associated APC-resistance. We have shown that the impaired anticoagulant activity of FV_{Leiden} accounts for half of the APC-resistance measured with the classical aPTT-based assay, an assay commonly used in clinical settings. Furthermore, we have demonstrated the physiological importance of the APC-cofactor activity of FV by means of thrombin generation measurements in plasmas with different FV concentrations triggered with tissue factor in the presence of APC. For FV levels between 60% and 120%, the amount of thrombin formed in plasma *decreased* at *increasing* FV concentration, due to the anticoagulant activity expressed by normal FV. In contrast, similar increasing concentrations of FV_{Leiden} (which does not express APC-cofactor activity) did not influence thrombin generation in the presence of APC. Finally, we have shown that FV-R2 expresses ~73% of the APC-cofactor activity of normal FV. This reduced APC-cofactor activity of FV-R2 in plasma from a homozygous R2-carrier results in the generation of twice as much thrombin in the presence of APC as compared to normal plasma.

The patho-physiological relevance of the anticoagulant activity of FV is further illustrated by a rare prothrombotic condition known as pseudo-homozygous APC-resistance (**chapter 4**). Pseudo-homozygotes are heterozygous carriers of FV Leiden whose counterpart (non-Leiden) FV allele is not expressed due to a null mutation. To characterize the APC-resistance phenotype associated with FV_{Leiden} pseudo-homozygosity, we have compared FV_{Leiden} pseudo-homozygotes, homozygotes and heterozygotes using 4 different APC-resistance assays which probe FVa inactivation, FVIIIa inactivation or both. FV_{Leiden} pseudo-homozygotes were more APC-resistant

than heterozygotes and were comparable to homozygotes in all assays. These findings can be explained by the fact that FV_{Leiden} has no APC-cofactor activity and the normal FV present in heterozygous plasma acts as a cofactor for APC in the inactivation of FVIII(a). These results were confirmed in a plasma model system, where the different FV genotypes were mimicked by reconstituting FV-deficient plasma with purified normal FV and/or FV_{Leiden}. Furthermore, we showed that when normal FV is titrated into pseudo-homozygous plasma, the APC-resistance of this plasma progressively decreases presumably due to the APC-cofactor activity expressed by the added normal FV. This can once again be explained by the fact that by increasing the concentration of normal FV in the pseudo-homozygous plasma, we increase the amount of FV expressing anticoagulant activity, resulting in a decrease of the APC-resistance. We concluded that the expression level of the non-Leiden allele in heterozygous FV_{Leiden} carriers is an important determinant of the APC-resistant phenotype of these individuals.

Finally, in **chapter 5** we investigated the relationship between plasma prothrombin levels and APC-resistance. In prothrombin-deficient plasma reconstituted with purified prothrombin, APC-resistance increased with increasing prothrombin concentrations, both in the aPTT-based and in the thrombin generation-based APC-resistance assays. In a population of healthy individuals the same trend was observed in the aPTT-based but not in the thrombin generation-based APC-resistance assay. This discrepancy was due to the strong correlation between the plasma levels of prothrombin and protein S in the population. Whereas high prothrombin on the one hand increases APC-resistance, this is counteracted by the high protein S level. Thus, the protein S levels in plasma play an important role in modulating the severity of the APC-resistance caused by elevated prothrombin levels. Prothrombin titrations in plasmas containing different amounts of protein S confirmed the ability of protein S to modulate the APC-resistance induced by elevated prothrombin levels. Therefore, the prothrombin/protein S ratio might provide a more accurate prediction of the APC-resistance in a given plasma than the prothrombin level alone. These findings suggest that carriers of the prothrombin 20210 G/A mutation, since they have a higher prothrombin/protein S ratio than non-carriers, may experience a higher thrombosis risk than non-carriers with comparable prothrombin levels.

Samenvatting

Het stollen van bloed is een complex gebeuren, waarbij via enzymatische reacties de inactive stollingsfactoren in het bloed worden geactiveerd. De vorming van trombine is een centraal gebeuren in deze stollingscascade. Daarom is een goede regulatie van de hoeveelheid trombine dat gevormd wordt noodzakelijk voor het behoud van een hemostatisch evenwicht. Het proteïne C systeem is een belangrijk anticoagulant mechanisme wat een rol speelt bij deze regulatie. Geactiveerd proteïne C (APC) is een vitamine-K-afhankelijk eiwit dat de cofactoren van zowel het intrinsiek (FVIIIa) als het extensiek systeem (FVa) inactieveert. Bij deze inactiveringen fungeert proteïne S als cofactor van APC. Bovendien heeft men aangetoond dat FV ook APC-cofactor activiteit bezit in de inactivering van FVIII(a). In sommige gevallen blijkt het plasma resistent te zijn tegenover de regulerende werking van APC. Dit wordt APC-resistentie genoemd. APC-resistentie wordt geassocieerd met een verhoogd risico op veneuze thrombose.

APC-resistentie wordt vaak veroorzaakt door een puntmutatie in het FV gen, die leidt tot de substitutie van een arginine op positie 506 door een glutamine. Deze mutatie wordt aangeduid als FV_{Leiden}. Aangezien één van de APC-splitsingsplaatsen hierdoor wordt getroffen, is FVa_{Leiden} minder gevoelig voor inactivatie door APC. Aangezien FV ook gesplitst dient te worden door APC bij Arg⁵⁰⁶ om als cofactor van APC te kunnen fungeren bij de inactivatie van FVIII(a), leidt deze mutatie ook tot een gereduceerde anticoagulante activiteit van FV. Naast de FV_{Leiden} mutatie zijn er ook nog andere mutaties in het FV gen mogelijk die APC-resistentie veroorzaken, zoals bijvoorbeeld het R2-haplotype. Het R2-haplotype omvat een reeks van mutaties die altijd samen voorkomen. Deze mutaties hebben echter geen effect op de inactivatie van FVa-R2 door APC, maar treffen specifiek de cofactor activiteit van FV-R2 in de FVIIIa inactivering.

Het FV(a) in plasma kan dus zowel een substraat zijn van APC, alsook fungeren als een cofactor voor APC. Mutaties in het FV gen kunnen dus APC-resistentie veroorzaken ofwel door de inactivering van FVa te beïnvloeden, ofwel door de cofactor activiteit van FV bij de inactivering van FVIII(a) te reduceren. In dit proefschrift hebben wij ons voornamelijk gericht op de APC-cofactor activiteit van FV en zijn rol in APC-resistentie.

Hoofdstuk 2 beschrijft experimenten om te achterhalen waarmee een aminozuur verandering op positie 2194 van het FV molecule, waarbij een asparaginezuur in een glycine verandert, de hoofdoorzaak is voor de gereduceerde FV concentratie in het plasma van mensen met het R2-haplotype. Moleculair dynamische en electrostatische computer simulaties geven aan dat de Asp2194Gly mutatie leidt tot een algemene destabilisering van het C2 domein van FV. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat deze mutatie

de electrostatische interacties tussen Asp2194-Lys2101-Lys2103 verstoort. Onder normale omstandigheden (geen mutatie) zorgen deze interacties ervoor dat het N-terminaal en het C-terminaal deel van het C2-domein in elkaars buurt komen, waardoor de vorming van een disulfide brug tussen Cys2038 en Cys2193 bevorderd wordt. Dit resulteert in een stabilisatie van het eiwit. Aangezien deze Asp2194Gly mutatie de electrostatische interacties teniet doet, wordt de correcte vouwing van het C2-domein bemoeilijkt. Dit resulteert in de retentie en degradatie van incorrect gevouwen FV moleculen in het endoplasmatisch reticulum en leidt uiteindelijk tot een verminderde FV expressie. Deze computer data werden bevestigd door middel van experimenten met recombinante eiwitten, waarmee ook aangetoond werd dat niet alleen de Asp2194Gly mutatie maar om het even welke mutatie die de electrostatische interacties tussen Asp2194-Lys2101-Lys2103 treft, leidt tot een sterk verminderde expressie van het FV molecule.

In **hoofdstuk 3** hebben we ons geconcentreerd op de anticoagulante activiteit van FV in de inactivering van FVIII(a) door APC en het belang hiervan voor APC-resistentie. Hoewel het nu algemeen aanvaard is dat de gereduceerde inactivering van FV_{Leiden} door APC en de verminderde APC-cofactor activiteit van FV_{Leiden} beide bijdragen tot de waargenomen APC-resistentie, is de relatieve bijdrage van beide componenten nooit bepaald. Wij hebben aangetoond dat de verminderde anticoagulante werking van FV_{Leiden} voor de helft verantwoordelijk is voor de APC-resistentie, waargenomen met een klassieke aPTT-based APC-resistentie assay, een test die veel gebruikt wordt in klinische laboratoria. Verder hebben we het belang van de APC-cofactor activiteit van FV laten zien door trombine generatie metingen in plasmas met verschillende FV concentraties, in aan en afwezigheid van APC. In aanwezigheid van APC leidt een *verhoging* van de FV concentratie (boven 60% van de normale hoeveelheid in plasma) tot een *vermindering* van de hoeveelheid gevormd trombine. Dit geeft aan dat 60% FV genoeg is voor een optimaal procoagulante werking en dat een verdere toename van de FV concentratie resulteert in een toename van anticoagulante eigenschappen van FV. Bij FV_{Leiden}, dat geen APC-cofactor activiteit heeft, gaf een dergelijk experiment geen vermindering in trombine generatie te zien. We hebben ook laten zien dat de APC-resistentie geassocieerd met de R2-haplotype veroorzaakt wordt door een verminderde APC-cofactor activiteit van FV-R2. Hierdoor wordt, in aanwezigheid van APC, in het plasma van een homozygote drager van het R2-polymorfisme twee keer zoveel trombine gevormd als in normaal plasma.

De patho-fysiologische betekenis van de anticoagulante activiteit van FV werd geïllustreerd in **hoofdstuk 4**, door het vergelijken van plasma van pseudo-homozygote, homozygote en heterozygote FV_{Leiden} dragers met plasma

van normale individuen. Met behulp van vier verschillende APC-resistentie testen hebben we een gedetailleerde karakterisatie verricht van het APC-resistente fenotype geassocieerd met deze verschillende FV_{Leiden} genotypes. Op basis van de resultaten kunnen we besluiten dat pseudo-homozygoten en homozygoten van de FV_{Leiden} mutatie even resistent zijn voor APC, terwijl heterozygote FV_{Leiden} dragers beduidend minder resistent zijn voor inactivatie door APC. Deze resultaten worden verklaard door het feit dat FV_{Leiden} geen APC-cofactor activiteit vertoont en dat normaal FV wel als cofactor voor APC fungeert bij de inactivering van FVIII(a). Dit komt volledig overeen met de model experimenten uitgevoerd in hoofdstuk 3, waarbij deze verschillende FV_{Leiden} genotypes gesimuleerd werden door FV deficient plasma te reconstitueren met gezuiverd FV_{Leiden} en/of normaal FV. Verder hebben bijkomende experimenten aangetoond dat wanneer we FV, van nature een procoagulant eiwit, titreren in een pseudo-homozygoot plasma, de APC-resistentie van dit plasma geleidelijk afneemt. Deze waarneming impliceert dat de mate waarmee het non-Leiden allel tot expressie komt in een heterozygote FV_{Leiden} drager in belangrijke mate bijdraagt tot de individuele APC.

Tot slot, in **hoofdstuk 5** hebben we APC-resistentie bestudeerd die geassocieerd is met verhoogde protrombine concentraties in plasma. De aPTT-based test bevestigde dat de APC-resistentie in een plasma toeneemt met toenemende protrombine concentraties, zowel in een model systeem als in een populatie gezonde donoren. Hetzelfde was waar voor het model systeem, gemeten met de ETP-based test. Er was echter een discrepantie met de ETP-based test tussen de resultaten van het model systeem en de metingen in de populatie gezonde individuen. Maar na correctie voor de protein S concentraties in de populatie, werden gelijkaardige resultaten bekomen als in het model systeem. Hieruit kunnen we concluderen dat protein S het effect dat verhoogde protrombine heeft op de APC-resistentie tegenwerkt. Met andere woorden, de protein S concentratie in plasma speelt een belangrijke rol bij het moduleren van de APC-resistentie, veroorzaakt door verhoogde protrombine levels. Dit werd bevestigd wanneer we protrombine titreerden in plasmas met verschillende concentraties protein S. Aangezien de protrombine en protein S concentraties in plasma sterk gecorreleerd zijn, geeft de protrombine/protein S ratio een juister voorspelling van de APC-resistentie dan de protrombine concentratie alleen. Deze bevindingen suggereren ook dat dragers van de protrombine mutatie (G20210A), die een hogere prothrombine/protein S ratio hebben, een hogere risico voor thrombose hebben dan niet-dragers met vergelijkbare protrombine concentraties.